

Rec PCT/PTO 04 OCT 2004

PCT/EP 03 / 03 497

10/509917



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

REC'D 23 MAY 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02007640.2

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk

**BEST AVAILABLE COPY**



Anmeldung Nr:  
Application no.: 02007640.2  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 04.04.02  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

GBF Gesellschaft für Biotechnologische For-  
schung mbH  
Mascheroder Weg 1  
38124 Braunschweig  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins als Adjuvans bei therapeutischer  
oder prophylaktischer Vakzinierung

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A61K39/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

**GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH**  
**Mascheroder Weg 1**  
**38124 Braunschweig**

Unser Zeichen:

3275-1 DE-1

Datum:

4. April 2002

### **Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins als Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung**

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins als Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung, insbesondere über die Schleimhäute, d.h. als Mucosal-Adjuvans.

Ein Drittel aller jährlichen Todesfälle in der Welt werden noch immer durch Infektionskrankheiten verursacht, die außerdem für wenigstens 15 % der Krebsneuerkrankungen verantwortlich sind. Infektionskrankheiten sollen ferner in die Pathophysiologie verschiedener chronischer Krankheiten entzündlicher, vaskulärer oder degenerativer Art verwickelt sein. Infektionskrankheiten verursachen der Allgemeinheit hohe Kosten durch Behandlungskosten und Arbeitsausfall der Erkrankten.

Zur Abwehr von Infektionskrankheiten werden generell zwei Wege verfolgt, nämlich Therapie und Prophylaxe. Hierbei sind Impfungen zur wirksamsten Waffe gegen Infektionskrankheiten geworden. Es gibt jedoch noch viele Infektionskrankheiten, für die noch keine Vakzine zur Verfügung stehen oder eine hinreichende Immunisierung nicht erreicht werden kann. Viele Vakzine sind unzureichend wegen geringer Effizienz, schweren Nebenwirkungen, geringer Stabilität oder hoher Kosten. Es besteht daher ein starkes Bedürfnis für neue und verbesserte Impfstoffe (Vakzine).

Traditionell wurden Vakzine für die Prophylaxe bei Infektionskrankheiten angewendet und sind auf diesem Gebiet für viele Krankheiten gut eingeführt. Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass Vakzinierungen außerdem ein sehr geeignetes Mittel bei der Immuntherapie anderer ansteckender Krankheiten sind, bei denen bisher noch nicht geimpft wurde, wie viraler Hepatitis, Helicobacter-pylori-Infektionen, Herpesvirus-Infektionen usw.. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Einbindung von Vakzinen bei Immuntherapien und Immunprophylaxen gegen Autoimmunkrankheiten, Entzündungskrankheiten, Tumoren, Allergien und zur Empfängnisverhütung bei Mensch und Tier. Teilweise (insbesondere auch im letztgenannten Fall) scheint die Verwendbarkeit von Vakzinen an einen effizienten mucosalen Verabreichungsweg und die damit verbundene Erzeugung einer guten mucosalen Immunreaktion gebunden zu sein.

Die meisten Infektionen sind entweder auf die Schleimhäute beschränkt oder die Krankheitsauslöser müssen während früher Infektionsphasen die Schleimhaut passieren. Es ist daher unbedingt anzustreben, dass bei einer Vakzinierung nicht nur eine systemische sondern vor allem auch eine mucosale Immunantwort erhalten wird, um hierdurch sowohl die Infektion (Kolonisierung) als auch die Ausbildung der Krankheit primär zu stoppen. Eine gute mucosale Immunantwort würde die Ansteckungsgefahr deutlich herabsetzen.

Dadurch dass sich das systemische und das mucosale Immunsystems zwar teilweise überlappen, aber nicht identisch sind, sind parenteral verabreichte Vakzine für den Schutz gegen mucosale Pathogene weniger wirksam (McGhee, Mestecky et al., "The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development", Vaccine 10, 75-88 (1992)). Tatsächlich stimulieren parenteral verabreichte Vakzine im wesentlichen systemische Immunantworten, während auf mucosalem Weg, d.h. über die Schleimhäute, verabreichte Vakzine die Immunantwort nachbilden, wie sie durch natürliche Infektionen hervorgerufen wird. Auf diese Weise führt die mucosale Immunisierung zu wirkungsvollen systemischen und mucosalen Immunantworten.

Weiterhin ist zu erwarten, dass die mucosale Verabreichung von Vakzinen weniger Nebenwirkungen mit sich bringt und bei den Patienten gut akzeptiert

wird. Auf mucosalem Weg sind Vakzine leichter zu verabreichen und besser in Übereinstimmung mit Vakzinierungsprotokollen zu bringen. Ihre Bereitstellung ist mit geringeren Kosten verbunden.

Die Verabreichung von Antigenen auf mucosalem Weg ist bisher mit einigen beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden. Ein Hauptproblem besteht darin, dass die so verabreichten Antigene häufig kaum immunogen sind. Dies beruht auf unterschiedlichen Mechanismen wie (i) beschleunigte Antigen-Eliminierung durch nicht-spezifische Clearance-Mechanismen des Wirts (beispielsweise Zilienaktivität, Peristaltik), (ii) Antigen-Abbau durch lokal wirkende Enzyme, (iii) Antigen-Veränderung und/oder strukturelle Modifizierung infolge extremer pH-Werte (saures Milieu im Magen, alkalisches im Intestinaltrakt), (iv) schwache Antigen-Durchlässigkeit der Schleimhäute sowie (v) nur sehr begrenzter Zugang zu Antigen-präsentierenden Zellen.

Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten werden verschiedene Strategien angewendet, z.B., Einschluss oder Assoziation der Antigene mit Partikeln (Mikropartikeln, Nanopartikeln, Bakterien oder Bakterienfragmenten) als Träger, Verwendung virenartiger Konstrukte, Verwendung von Liposomen, ISCOMS (immunstimulatorische Komplexe) oder Virosomen, Verwendung transgener Pflanzen, Antigen-Produktion durch abgeschwächte virale oder bakterielle Träger, entweder als übliche Vektoren oder als Träger für Nukleinsäure-Vakzine und/oder die Verabreichung dieser Hilfsmittel mit mucosalen Adjuvantien. Trotz intensiver Bemühungen auf diesem Gebiet sind bisher praktisch keine hinlänglich wirksamen und gleichzeitig gut verträglichen mucosalen Adjuvantien zur Praxisreife geführt worden.

Als "Adjuvantien" werden Substanzen bezeichnet, die bei einer Immunisierung dem eigentlichen Antigen (d.h. der Substanz, die die gewünschte Immunreaktion provoziert) beigefügt werden, um die humorale und/oder zellvermittelte Immunantwort zu verstärken ("Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie", 1. Band, Spektrum Akademischer Verlag 1995). Die Verwendung vieler Adjuvantien beruht allein auf Erfahrung, wobei die Wirkung weder genau zu erklären noch voraussagen ist. Traditionell werden vor allem folgende Gruppen von

Adjuvantien verwendet: Aluminiumhydroxid, Emulsionen von Mineralölen, Saponine, Detergentien, Siliziumverbindungen, Thioharnstoff, Endotoxine gramnegativer Bakterien, Exotoxine grampositiver Bakterien, abgetötete Bakterien oder deren Teile.

Die Verwendung optimaler Adjuvantien spielt bei der Vakzinierung eine entscheidende Rolle. Ohne Adjuvans verabreichte Antigene vermitteln nur selten eine ausreichende Immunantwort. Darüber hinaus kommt es nicht nur auf die Stärke der hervorgerufenen Immunantwort an, sondern auch auf ihre Qualität. Die Stimulierung eines falschen Immunisierungsmusters kann zu immunopathologischen Reaktionen und Verschlechterung der Infektionssymptome führen. In diesem Zusammenhang kann das Adjuvans helfen, die gewünschte Immunreaktion zu unterstützen.

Die für den Menschen zugelassenen Adjuvantien sind begrenzt. Eines der wenigen von den Zulassungsbehörden für den Menschen akzeptierten Adjuvantien ist Aluminiumhydroxid. Aus der Tatsache, dass ein Adjuvans bei systemischer Applikation aktiv ist, also die Wirkung eines Antigens unterstützt, lässt sich nicht darauf schließen, dass dies auch für andere Applikationswege gilt. Ein typisches Beispiel ist das Aluminiumhydroxid, welches die Immunogenität einer Substanz bei intramuskulärer, subkutaner, intraperitonealer oder intradermaler Gabe unterstützen kann, das jedoch bei mucosaler Gabe vollständig unwirksam bleibt.

In den letzten Jahren ist intensiv nach neuen Adjuvantien, auch solchen für der mucosalen Verabreichungsweg, gesucht worden. Nur wenige Stoffe wurden gefunden, die in der Lage sind Mucosalantworten zu verstärken. Unter diesen wirken einige als Träger, an die die Antigene gebunden oder mit diesen fusioniert werden müssen. Weit weniger wurden universell einsetzbare "echte" Adjuvantien gefunden, die den Antigenen zugemischt werden.

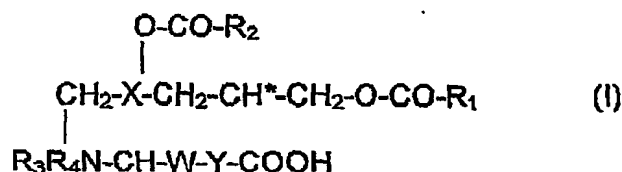
Als echte Mucosal-Adjuvantien wurden das hitzeinstabile Toxin aus *Escherichia coli* und das Cholera toxin aus *Vibrio cholerae* entdeckt. Von beiden wurde eine Wirksamkeit als Mucosal-Adjuvans beschrieben (Holmgren et al, "Cholera toxin

and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigenvector system", Vaccine 1179-1184, 1993 und Douce et al, "Mutants of Escherichia coli heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1644-1648). Die ihnen innewohnende Toxizität und die potentiellen Nebenwirkungen beeinträchtigen jedoch ihre Verwendbarkeit im Zusammenhang mit Vakzinierungen beim Menschen. Obwohl auf gentechnischem Wege nicht-toxische Derivate dieser Moleküle erzeugt wurden, werden noch immer starke, nicht tolerierbare Nebenwirkungen berichtet, wie krankhafte Veränderungen der Respirationsschleimhaut und Eindringen des Toxins in das Gehirn (N. Garçon, Präsentation auf dem "World Vaccine Congress", Genf, 26. bis 28. September 1999; und: van Ginkel, F.B. et al., „cutting edge: The Mucosal Adjuvant Cholera Toxin Redirects Vaccine Proteins into Olfactory Tissues", J. Immunol. 2000, 165, 4778-4782).

Es besteht daher noch immer ein dringendes Bedürfnis für neue verträgliche und effektive Mucosal-Adjuvantien.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, eine Palette neuer, hochwirksamer und für den Menschen nicht-toxischer Mucosal-Adjuvantien zu entwickeln, die mit den verschiedensten zu unterstützenden aktiven Bestandteilen in herkömmlichen oder neuartigen Vakzinen wie insbesondere prophylaktischen oder therapeutischen Impfstoffen einschließlich Krebs- und DNA-Vakzinen, einsetzbar sind.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird die Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins der Struktur (I) als Mucosal-Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung über die Schleimhäute vorgesehen,



wobei

$R_1$  und  $R_2$ , die gleich oder voneinander verschieden sein können, für  $C_{7-25}$ -Alkyl,  $C_{7-25}$ -Alkenyl oder  $C_{7-25}$ -Alkynyl,

X für S, O oder  $CH_2$ ,

$R_3$  und  $R_4$  unabhängig voneinander für H oder Methyl und

Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiologisch verträgliche und in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz stehen

und das mit \* markierte asymmetrische Kohlenstoffatom die absolute S-Konfiguration hat, wenn X = S (Schwefel) ist.

Zwar wurde in der DE 19652586 A1 bereits die Verwendung eines bestimmten S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptids mit zwei esterartig an die Dihydroxypropylgruppe gebundenen Fettsäuren als Vakzin-Adjuvans miterwähnt, jedoch rein hypothetisch und ohne Bezug auf Mucosaladjuvantien, sodass von einer üblichen Vakzinierungsrouten auszugehen ist.

Vorzugsweise ist die carboxyterminal an die 2,3-diacyloxypropyl-substituierte Aminosäure gebundene Aminosäuresequenz (Y) ausgewählt aus folgenden Sequenzen:

- a) GQTNT,
- b) SKKKK,
- c) GNNDESNISFKEK oder
- d) GQTDNNSSQSAAPGSGTTNT.

Derzeit besonders bevorzugt ist ein S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]cysteinyl-peptid, wobei die Peptidkette wiederum eine aus 1 bis 25 Aminosäuren bestehende physiologisch verträgliche, in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz sein kann.

Nach derzeitiger Erkenntnis könnte die carboxyterminale Peptidkette eine die Hydrophilizität oder Lipophilizität des Lipopeptids steuernde und gegebenenfalls modifizierende Funktion haben, sodass generell alle Peptid- oder Proteinketten, die - je nach Einsatzzweck der Vakzine - dieses Kriterium erfüllen, verwendet werden können. Die Peptidkette sollte physiologisch verträglich und



insbesondere nicht selbst in der verwendeten Spezies (d.h. der geimpften (vakzinieren) Spezies, ob Mensch oder Tier) immunogen sein.

Als entscheidend für die Wirksamkeit als Mucosal-Adjuvans wird derzeit die Struktur gemäß Formel (I) angesehen, wobei dem asymmetrischen Zentrum an der bezeichneten Stelle eine zentrale Bedeutung zuzukommen scheint.

Das erfindungsgemäße Mucosaladjuvans kann mit allen dem Fachmann bekannten Methoden an das für die Vakzinierung vorgesehene Antigen oder aktive Molekül gebunden, gemeinsam mit diesem in physikalische (z.B. Micropartikel, Nanopartikel, Liposomen, ISCOMS, Polymere) oder biologische Partikel (Bakterien, Bakterienteile) oder Virosomen inkorporiert oder mit dem Antigen gemischt werden. Bei der Bindung an Träger können auch Transportmoleküle oder Transportproteine als Träger vorgesehen sein.

Vorzugsweise liegt das erfindungsgemäß verwendete Lipoprotein oder Lipopeptid gemäß der o.a. Formel (I) in einer Zubereitung mit der aktiven Vakzinierungskomponente (z.B. dem Antigen) vor, die für intranasale, intra-NALT (nasal associated lymphoid tissue), aerosolisiert, orale, intrarektale, conjunctivale, intravaginale, intraurethrale Applikation oder für die Applikation in die Milchgänge der weiblichen Brust geeignet und vorgesehen ist. Alternativ kann das erfindungsgemäße Mucosal-Adjuvans in einem Kit für die Co-Applikation mit einem Vakzin auf einem der vorgenannten Wege vorliegen und gegebenenfalls hierfür angepasst sein.

Das Lipopeptid oder Lipoprotein nach der Erfindung wird insbesondere synthetisch erhalten. Erfindungsgemäße Lipopeptide könnten auch mit auf dem Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren aus einem Mykoplasma-Klon insbesondere vorteilhaft aus einem *Mykoplasma-fermentans*-Klon erhalten werden.

In Weiterbildung der Erfindung kann das Lipopeptid oder Lipoprotein in einer Zubereitung mit wenigstens einem weiteren Adjuvans und/oder Antigen vorliegen. Insbesondere kann es mit ein oder mehreren entzündungshemmenden, anti-angiogenen, cytotoxischen oder

immunmodulatorischen Stoffen oder Liganden (z.B. Chemokinen, Cytokinen, CD40-Ligand) oder mit Antikörpern gemeinsam verabreicht oder in einer Zubereitung mit diesen gegeben werden.

Das Lipopeptid oder Lipoprotein kann auch, wie oben bereits angesprochen, mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert oder verbunden sein. Es kann weiterhin in einer Zubereitung mit weiteren Zusatz- und Hilfsstoffen, insbesondere Konservierungsstoffen oder Stabilisatoren enthalten sein und eingesetzt werden.

Die Erfindung stellt einen großen Fortschritt bei den Bemühungen zur Bereitstellung effektiver Mucosal-Adjuvantien dar. Das Lipopeptid kann im Rahmen der Formel (I) modifiziert und damit in seiner qualitativen und quantitativen Wirksamkeit variiert und an die gewünschte Verwendung angepasst werden. Es ist vergleichsweise kostengünstig herstellbar und für den Menschen nicht toxisch. Vergleichsweise geringe Beimischungsmengen genügen in den meisten Fällen für deutliche Verstärkungseffekte. Die erfindungsgemäßen Lipopeptide sind in ihren chemischen und biochemischen Eigenschaften gut charakterisiert und besonders auf synthetischem Wege genügend rein erhältlich (Mühlradt, P.F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, G. Jurg (1997); Isolation, structure, elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration"; J. Exp. Med. 185: 1951; and Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P.F. Mühlradt, and S. Akira (2000); „Cutting edge: Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway"; J. Immunol. 164:554, aber siehe Erratum in J. Immunol. (2000), 165:5995). Schwerwiegende Nebenwirkungen sind daher nach derzeitiger Kenntnis nicht zu erwarten.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass bei Immunisierungen unter Beimischung des erfindungsgemäßen Mucosal-Adjuvans hohe Konzentrationen an IgA in den Schleimhautsekreten behandelter Versuchstiere gefunden wurden.

Diese Antikörperspezies ist für den Schutz der Schleimhäute vor Infektionen von besonderer Bedeutung.

Da derzeit überhaupt keine wirksamen Adjuvantien für die intranasale Immunisierung bei humanen Patienten zugelassen sind, stellt die Erfindung einen bedeutenden medizinischen Fortschritt auf diesem Gebiet dar.

Die in dieser Erfindung beschriebenen Lipopeptide oder Lipoproteine der allgemeinen Struktur (I) lassen sich auch generell, d.h. auf anderen Wegen als dem mucosalen, als Adjuvantien verwenden, einschließlich besonderer Applikationen für DNA-Vakzine, Krebsvakzine, Vakzine gegen nicht infektiöse Krankheiten und dergleichen, wobei die vorbekannten MALP-2-Peptide, nämlich S-(2,3-Diacyloxypropyl)cystein-peptide der Sequenz DhcIGNNDESNISFKEK, wobei N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sein können, für die üblichen Vakzinierungswege (intramuskulär, subkutan, intradermal, intraperitoneal) ausgenommen werden.

Die erfindungsgemäßen Adjuvantien lassen sich mit den verschiedensten Antigenen zu Impfstoffen kombinieren. Als Antigene können insbesondere Zielantigene für die Prophylaxe und Behandlung von Infektionskrankheiten, Tumoren, Autoimmunkrankheiten, Allergien sowie chronischer oder akuter entzündlicher Krankheiten ausgewählt werden. Die Auswahl kann u.a. aus dem Antigen-Pool von Infektionserregern wie Viren, Bakterien, Parasiten, Rickettsien, Mycoplasmen, Pilzen und dergleichen erfolgen. Unter einer Impfung wird auch eine Behandlung mit Antigenen zur Fertilitätskontrolle in menschlichen oder tierischen Populationen verstanden.

Die aus den Beispielen zu entnehmenden vorteilhaften Eigenschaften des erfindungsgemäßen Mucosal-Adjuvans lassen sich aus keiner Veröffentlichung vor dieser Anmeldung ableiten.

## Methodischer Ansatz für die Experimente/Untersuchungen

Im Vorfeld wurden zunächst *in vitro*-Screening Studien durchgeführt, um das Potential der untersuchten Lipopeptide bezüglich der Aktivierung antigenpräsentierender Zellen abschätzen zu können. Als Zielzellen wurden knochenmarkstämmige dendritische Zellen verwendet, die aus Vorläufern mit Hilfe von GM-CSF erhalten wurden. Ganz im Gegensatz zu dem, was aufgrund der Aktivität von MALP -2 gegenüber Makrophagen erwartet werden konnte, zeigte MALP-2 nur schwache Aktivität gegenüber primären dendritischen Zellen. Im Vergleich mit den Kontrollproben, die im Beisein von *E. coli* Lipopolysacchariden (LPS, 10 ng/ml) inkubiert worden waren, wurde eine sehr schwache Aktivierung dendritischer, mit 5 ng/ml MALP-2 behandelter Zellen beobachtet.

Aufgrund dieser Voruntersuchungen konnte für MALP-2 und entsprechende Lipopeptide keine Eignung als Adjuvans erwartet werden, da von Adjuvantien eine gewisse Fähigkeit zur Aktivierung dendritischer Zellen vorausgesetzt wird. Dendritische Zellen sind die Hauptgruppe antigenpräsentierender Zellen überhaupt. Sie spielen bei der primären Immunantwort eine zentrale Rolle, wobei sie (1.), die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen darstellen, (2.) die wichtigste Epitopenquelle für spezifische T-Zellen Klone sind, und (3.) die wichtigsten Aktivatoren ruhender T-Zellen sind, welche primäre Immunantworten *in vivo* hervorrufen können. Während mit LPS behandelte dendritische Zellen eine starke Hochregulierung bzw. Vermehrung von CD40 einschließlich CD80 und CD86 zeigen, kann bei MALP-2 behandelten dendritischen Zellen wenn überhaupt, dann nur ein schwacher Effekt bemerkt werden.

Dies war teilweise zu erwarten und in Übereinstimmung mit den an Makrophagen erhaltenen Ergebnissen. Dort war gefunden worden, dass nach einer anfänglichen Hochregulierungsphase bei anhaltender Behandlung mit MALP-2 ein erhöhter Umsatz und verringerte Expression von MHC Klasse II Molekülen, die für die richtige Antigen Präsentation wesentlich sind, auftrat (M. Frisch et al., Eur. J. Immunol. (1996) 26, 1050-1057). Desto überraschender ist die gefundene Wirkung als Adjuvans.

Die Ergebnisse der Vorversuche sprachen daher zunächst stark gegen eine mögliche Aktivität der hier untersuchten Lipopeptide und -proteine als Adjuvantien.

Obwohl diese *in vitro* Studien nahelegten, dass die fraglichen Lipopeptide hier keine Erfolge versprachen, wurden sie als negative Kontrollproben, nämlich als schlecht wirkende Beispiele Makrophagen-aktivierender Substanzen, in *in vivo* Studien der Erfinder mit einbezogen, da die Substanzen aus früheren Versuchen vorhanden waren.

Überraschenderweise, da in völligem Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen, wurde gefunden, dass beispielsweise MALP-2 bei Gabe zusammen mit dem Modell-Antigen  $\beta$ -Galactosidase auf entweder intranasalem (i.n.) oder intraperitonealem (i.p.) (Anmerkung: im Tiermodell) Weg in einer Dosis von nur 0,5  $\mu$ g pro Tier pro Dosis die  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen IgG-Serumtiter um das 675 bis 3560-fache (i.n.) bzw. das 64 bis 128-fache (i.p.) heraufsetzen konnte. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Lipopeptide können bereits nach der Erstimmunisierung annähernd maximale IgG Antworten hervorgerufen werden, und diese IgG Titer entsprechen denen bei Gabe von 10  $\mu$ g (dreimolarem Überschuss) nativem Cholera-Toxin Untereinheit B (CTB), einem gut charakterisierten mucosalen Adjuvans. Ähnliche Ergebnisse werden bei intradermaler oder subkutaner Verabreichung der erfindungsgemäßen Lipopeptide und -proteine gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Gabe der erfindungsgemäßen Lipopeptide und -proteine in wenigstens 3fach geringerer (molarer) Konzentration verglichen mit herkömmlichen Adjuvantien erfolgen kann und sollte.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Verabreichung der erfindungsgemäßen Lipopeptide auf intranasalem Wege zu einer wirksameren Stimulierung des mucosalen Immunsystems insgesamt führt. So wurden bei Gabe von MALP-2 als Adjuvans zu dem Modell-Antigen bezogen auf das Gesamt-IgA 36 % bzw. 23 % antigenspezifisches IgA in Lungen- und Vaginal-Lavagen gefunden. Dies zeigt, dass die erfindungsgemäßen Lipopeptide nicht nur lokale mucosale Immunantworten hervorrufen können, sondern dass die Verbreitung von IgA-

produzierenden Zellen zu anderen entfernten Schleimhautgebieten in einem Maße erfolgt, das zu guten mucosalen Immunantworten führt. Diese Wirkung ist an den mucosalen Verabreichungsweg gebunden.

Die Mitverabreichung der erfindungsgemäßen Lipopeptide zum Antigen rief auch stärkere zelluläre Immunantworten hervor als CTB, sowohl regional in Lymphknoten als auch in der Milz ( $p < 0,05$ ). Die Analyse  $\beta$ -Galactosidase-spezifischer IgG-Isotypen und die Profile der durch *in vitro* stimulierte Zellen sekretierten Zytokine zeigten, dass die Mitverabreichung der Lipopeptide ein dominantes Th2-Antwortmuster auslöste. Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen daher, dass die erfindungsgemäßen Lipopeptide wirksame Adjuvantien für die mucosale Verabreichung von Antigenen in Vakzinen darstellen.

Ein wichtiger Aspekt, der hier hervorgehoben werden soll, ist, dass eine inkrementelle Erhöhung der Lipopeptid-Dosis (von den hier genannten optimalen Dosen ausgehend) zu einer stetigen Verringerung der Immunantwort führt. Dieser gegenläufige Effekt ist unerwartet und war aus dem Stand der Technik nicht herzuleiten.

## BEISPIELTEIL

### Allgemeines

Die in den Beispielen dargestellten Untersuchungen wurden vorrangig mit einem synthetischen, einem aus Mykoplasmen stammenden Lipopeptid weitgehend entsprechenden MALP-2 als Mucosal-Adjuvans zusammen mit  $\beta$ -Galactosidase als Model-Antigen durchgeführt. Dieses spezielle Beispiel-Lipopeptid wurde auf Grund seiner vorher bestimmten Eigenschaften (biochemische Eigenschaften, Makrophagen-stimulierende Aktivität) ausgewählt. Sofern nichts anderes angegeben, ist das in den Beispielen verwendete synthetische Lipopeptid S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]cysteinyl-GNNDESNISFKEK im folgenden stets einfach als "MALP-2" bezeichnet.

Die Dosen für MALP-2 wurden zunächst in Vorstudien eingegrenzt, in denen MALP-2 subkutan, intradermal, intranasal oder intraperitoneal an Mäuse verabreicht wurde. In allen Protokollen führte die gleichzeitige bzw. zusammengehörige Verabreichung von MALP-2 mit  $\beta$ -Galactosidase zu einem signifikanten Anstieg der Produktion  $\beta$ -Galactosidase-spezifischer Antikörper. Die induzierten Immunantworten, die in Anwesenheit von MALP-2 nach Impfung auf intranasalem oder intraperitonealem Wege erhalten wurden, wurden dann analysiert und mit den in Vergleichsversuchen mit CTB als Adjuvans erhaltenen verglichen.

Die Beispiele ergeben, dass die Verwendung von MALP-2 in einer Dosis von nur 0,5  $\mu$ g pro Verabreichung zu einer signifikanten Erhöhung sowohl der humoralen als auch der zellulären  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antworten führte. Bereits intraperitoneale Verabreichung führte zu einer verbesserten Immunantwort, die intranasale Route erwies sich jedoch als noch weit effektiver. Im Gegensatz dazu war ein dreifacher molarer Überschuss an CTB erforderlich, um vergleichbare systemische oder mucosale humorale Antworten zu erhalten. Bezüglich der zellulären Antworten zeigten Milzzellen von mit MALP-2 immunisierten Mäusen eine deutlich höhere Proliferation ( $p < 0,05$ ) als solche aus Tieren, die mit dem dreifachen molaren Überschuss an CTB vakziniert worden waren.

Die mit MALP-2 als Adjuvans auf intranasalem Wege erhaltene Primärantwort wurde bezüglich der Kinetik der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörper-Antwort durch die Anwesenheit hoher Antikörpertiter charakterisiert, die schon nach der Erstimmunisierung fast das Maximalplateau erreichten. Humorale und zelluläre Antworten fielen nach intranasaler Vakzinierung stärker aus, was auf eine differenzierte lokale Wirkung von MALP-2 hinweist, die entweder auf seine Bioverfügbarkeit oder die räumliche Verteilung der spezifischen Rezeptoren in den Zielzellen zurückgeführt werden könnte. Wie bereits beschrieben wurden auch in durch die Vakzinierungsroute nicht direkt erreichbaren Schleimhautgeweben deutliche Immunantworten gefunden, nämlich  $\beta$ -Galactosidase-spezifisches IgA in Lungen und Vaginal-Lavagen.

Die Untersuchungen im Rahmen der Erfindung haben daher ergeben, dass die erfindungsgemäßen Lipopeptide neue und potente Mucosal-Adjuvantien sind, wobei das Erfordernis, das Ziel-Antigen mit dem aktiven Lipopeptid zu konjugieren, im Gegensatz zu anderen Lipopeptiden entfällt.

Es wurden über den gesamten Verlauf der Experimente bei den geimpften Tieren keine schwerwiegenden Nebenwirkungen oder Zeichen akuter oder chronischer Toxizität beobachtet. Durch die relativ kurze Peptid-Einheit innerhalb der erfindungsgemäßen Lipopeptide besteht eine relativ geringe Immunogenizität, was die Gefahr, dass Immunantworten gegen die Lipopeptide selbst auftreten, minimiert. Es konnten nach intranasaler Verabreichung von MALP-2 als Adjuvans keine anti-MALP-2 Antikörper detektiert werden. Dies stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber Proteinen als Adjuvantien dar, da eine Immunantwort gegen das Adjuvans selbst eine spätere Immunantwort gegen einen anderen Impfstoff, der mit demselben Adjuvans verabreicht wurde, beeinträchtigen kann. Die erfindungsgemäßen Lipopeptide können in Impfstoffen gegen verschiedenste Pathogene sowie in Krebsvakzinen oder Vakzinen zur Fertilitätskontrolle eingesetzt werden. Weitere Vorteile der Erfindung liegen in der guten Haltbarkeit der Lipopeptide bei Lagerung, größerer Reinheit der synthetisch herstellbaren Lipopeptide und überschaubarem chemischem und biochemischem Verhalten.



### Legenden der Zeichnungsfiguren:

Fig. 1. *In vitro* Untersuchungen mit primären dendritischen Zellen: Primäre dendritische Zellen aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden unter Verwendung der Rekombinante GM-CSF ( $5 \times 10^4$  U/ml) durch *in vitro*-Reifung von Vorläufern gewonnen. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  E. coli Lipopolysaccharid (LPS) beziehungsweise  $5 \mu\text{g/ml}$  MALP2 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit CD11c-spezifischen Antikörpern (Dendritenzellmarkern) in Kombination mit Anti-CD40 oder Anti-CD80 oder Anti-CD86 doppelt markiert. Die Expression von CD40, CD80 beziehungsweise CD86 in den CD11c-markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Prozent positiver Zellen bezüglich der gesamten CD11c-positiven Population ausgedrückt.

Fig. 2. Analyse dendritischer Zellen nach Behandlung mit MALP-2 mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACScan):

Primäre dendritische Zellen aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden unter Verwendung der Rekombinante GM-CSF ( $5 \times 10^4$  U/ml) durch *in vitro*-Reifung von Vorläufern gewonnen. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  E. coli Lipopolysaccharid (LPS) beziehungsweise  $5 \mu\text{g/ml}$  MALP2 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit CD11c-spezifischen Antikörpern (Dendritenzellenmarkern) in Kombination mit Anti-CD40 oder Anti-CD80 oder Anti-CD86 doppelt markiert und die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Gates wurden auf der Grundlage einer Markierung mit nichtverwandten Kontrollantikörper-Isotopen gesetzt.

Fig. 3. Humoral-Immunantworten, angeregt nach einer Impfung mit MAPL-2 als Adjuvans:

Mäuse wurden über subkutane (s.c.), intraperitoneale (i.p.), intradermale (i.d.) und intranasale (i.n.) Routen mit entweder reiner  $\beta$ -Galactosidase ( $40 \mu\text{g}$ ) oder  $\beta$ -Galactosidase gemischt mit MALP-2 ( $0.5 \mu\text{g}$ ) an den Tagen 0, 7 und 14 immunisiert. Am Tag 28 nach der primären Immunisierung wurden Serumproben entnommen und der Titer der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörper wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als der reziproke  $\log_2$  des

geometrisch mittleren Endpunkttiters dargestellt. Zur Kontrolle bezogen wir eine Gruppe ein, in welcher die Tiere über die Route mit  $\beta$ -Galactosidase unter Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans immunisiert wurden.

Fig. 4. Humoral-Immunantworten, angeregt nach der Impfung unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans in einer Dosis von 1  $\mu$ g pro Tier und Immunisierung: Mäuse wurden über die intraperitoneale (i.p.) und intranasale (i.n.) Route mit entweder reiner  $\beta$ -Galactosidase (40  $\mu$ g/Dosis) oder  $\beta$ -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (1  $\mu$ g/Dosis) an den Tagen 0, 7 und 14 immunisiert. Am Tag 28 nach der primären Immunisierung wurden Serumproben entnommen und der Titer der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörper wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Absorptionswerte (OD 405 nm) dargestellt.

Fig. 5. Zellreaktionen, angeregt nach einer Impfung unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von MALP-2 als Adjuvans.

$\beta$ -Galactosidase-spezifische T-Zell-Proliferationsantworten von Mäusemilzzellen immunisiert über die Routen interperitoneal oder intranasal mit entweder reiner  $\beta$ -Galactosidase (40  $\mu$ g/Dosis) oder  $\beta$ -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (1 oder 0.5  $\mu$ g/Dosis) an den Tagen 0, 7 und 14. Am 28. Tag nach der primären Immunisierung wurden die Tiere getötet und die Milzzellen wurden in vitro vier Tage im Beisein von 20  $\mu$ g/ml löslicher  $\beta$ -Galactosidase re-stimuliert. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindizes (cpm Proben/cpm in nichtstimulierten Kontrollzellen) dargestellt.

Fig. 6. Kinetik von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen IgG-Antworten in Serien geimpfter Mäuse.

Gruppen von Tieren (n=5) wurden entweder intranasal (A) oder intraperitoneal (B) mit 50  $\mu$ g  $\beta$ -Galactosidase (x),  $\beta$ -Galactosidase plus 10  $\mu$ g CTB ( $\square$ ),  $\beta$ -Galactosidase plus 0.5  $\mu$ g MALP-2 ( $\Delta$ ) oder reiner Pufferlösung (o) geimpft. Die Tage der Impfungen (Tag 0, 14 und 21) sind mit den Pfeilen markiert. Die Ergebnisse sind als der reziproke  $\log_2$  des geometrischen Endpunkttiters dargestellt, die SEM (mittlere Standardabweichung) ist mittels senkrechter Linien angegeben.

Fig. 7.  $\beta$ -Galactosidase-spezifischer IgA in Lungen- und Vaginaauspülungen von intranasal geimpften Mäusen:

Die Ergebnisse sind als Prozent  $\beta$ -Galactosidase-spezifischer IgA bezüglich des insgesamt vorhandenen IgA dargestellt. Die SEM ist durch senkrechte Linien angegeben.

Fig. 8. Bestimmung der Serum-IgE-Niveaus nach Immunisierung unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans:

Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) und intranasal (i.n.) entweder mit reiner  $\beta$ -Galactosidase (40  $\mu$ g), ausschließlich MALP-2 oder  $\beta$ -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (0.5  $\mu$ g) an den Tagen 0, 7 und 14 geimpft. Am 28. Tag nach der Erstimmunisierung wurden Serumproben genommen und die Niveaus von IgE wurden mittels eines Capture-ELISAs bestimmt. Die Ergebnisse sind als IgE-Konzentrationen (ng/ml) dargestellt.

Fig. 9.  $\beta$ -Galactosidase-spezifische T-Zell-Proliferationsantworten der Milz (A und B) und regionaler Lymphknotenzellen (C) von intraperitoneal oder intranasal geimpften Mäusen:

Die Zellen wurden in vitro vier Tage lang mit unterschiedlichen Konzentrationen löslicher  $\beta$ -Galactosidase re-stimuliert. Die Ergebnisse sind als mittlerer cpm-Wert subtrahiert von den Hintergrundwerten nichtstimulierter Zellen aus Dreifachmessungen dargestellt. Die SEM ist durch senkrechte Linien dargestellt.

Fig. 10. In geimpften Mäusen stimulierte Th-Profile:

Serum- $\beta$ -Galactosidase-spezifische IgG-Isotypen und -Zytokine, ausgeschieden von in vitro stimulierten Milzzellen, wurden bei den geimpften Mäusen mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Konzentrationsverhältnisse von IgG1/IgG2a und IL-10/IL-2 (die am häufigsten gefundenen Zytokine) dargestellt.

Fig. 11. Zytokine ausgeschieden von in vitro stimulierten Zellen geimpfter Mäuse:

Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA im Flüssigkeitsüberstand von Zellen, welche 48 (IL-2) beziehungsweise 96 Stunden (IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10) lang im Besein von  $\beta$ -Galactosidase (20  $\mu$ g/ml) kultiviert wurden, gemessen. Die Ergebnisse sind als das Verhältnis zwischen den in den geimpften Gruppen

vorgefundenen Zytokinmengen im Vergleich zu der nicht-geimpften Kontrollmäusen dargestellt.

**Beispiel 1: *In vitro*-Stimulierung von primären aus dem Knochenmark gewonnenen dendritischen Nagetierzellen mittels MALP-2.**

**Versuchsprotokoll:** Kulturen primärer aus dem Knochenmark gewonnener dendritischer Zellen wurden von BALB/c-Mäusen nach *in vitro*-Reifung von Vorläufern im Beisein der Rekombinante GM-CSF ( $5 \times 10^4$  U/ml) nach den üblichen Verfahren erhalten. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit *E. coli* Lipopolysaccharid (LPS) oder 5 µg/ml MALP2 stimuliert. Nach 12 beziehungsweise 24 Stunden Stimulierung wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert, um die Expression von Oberflächenmarkern, die für die Fähigkeit zur Antikörperpräsentation von Bedeutung sind, festzustellen.

Um Verbindungen zu bestimmen, welche bei *in-vivo*-Anwendungen auf dem Gebiet der Vakzinierungen ein Potential als Adjuvans besitzen, wurde eine erste *in-vitro*-Untersuchung mit primären Kulturen aus Knochenmark stammender dendritischer Zellen durchgeführt. Es wurden dendritische Zellen ausgewählt, da sie die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen sind und bei der primären Immunantwort eine Schlüsselrolle spielen. Tatsächlich sind sie der einzige Zelltyp, der *in vivo* in der Lage ist, ruhende T-Zellen zur Initiierung einer primären Immunantwort zu aktivieren. Demzufolge wurden dendritische Zellen mit den untersuchten Einheiten oder LPS, was zur Kontrolle diente, behandelt. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, mit fluoreszenz-markierten Antikörpern, die spezifisch sind für zelluläre Marker, welche für die antigenpräsentierenden Fähigkeiten der dendritischen Zellen entscheidend sind, markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die vorgefundenen Ergebnisse (Fig. 1 und 2) zeigen, dass im Unterschied zur positiver Kontrollgruppe die Expression von CD40 und dem ko-stimulierenden Molekül CD86 in den mit MALP-2 behandelten dendritischen Zellen nicht erhöht war. Die Wirkung auf die Expression des co-stimulierenden Moleküls CD80 war gering, falls überhaupt vorhanden. Co-stimulierende Moleküle senden Signale, welche

MHC-Moleküle für die wirksame Aktivierung der T-Zellen wesentlich sind. Es wurde früher schon berichtet, dass die Wirkung bewährter Schleimhautadjuvantien (Mucosal-Adjuvantien) wie z.B. Choleratoxin mit einer selektiven Verstärkung der Expression co-stimulierender Moleküle verbunden ist. Demzufolge deuten die *in vitro* gefundenen Ergebnisse stark darauf hin, dass MALP-2 kein oder geringes Potential als Schleimhautadjuvans aufweist.

**Beispiel 2: Humoralantworten, angeregt nach einer Impfung über unterschiedliche Wege unter Verwendung von MALP-2 in unterschiedlichen Konzentrationen als Adjuvans.**

**Versuchsprotokoll:** Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c- (H-2d) Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und gemäß den örtlichen und EU-Richtlinien behandelt. Gruppen von jeweils 5 Mäusen wurden am Tag 1, 7 und 14 entweder mit 40 µg reiner  $\beta$ -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland), oder unter Zumischung von 1 beziehungsweise 0,5 µg von synthetischem MALP-2 geimpft. Für die intranasale Verabreichung (i.n.) wurden 10 µl in jedes Nasenloch appliziert, während bei der intraperitonealen, intradermalen und subkutanen Injektion  $\beta$ -Galactosidase mit beziehungsweise ohne MALP-2 in 400, 100 beziehungsweise 100 µl PBS resuspendiert wurde. 28 Tage nach der Erstimpfung wurden Serumproben entnommen und bei -20°C bis zur Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörper aufbewahrt. Nunc-Immuno MaxiSorp-Testplatten mit 96 Mulden (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 100 µl  $\beta$ -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland), mit 5 µg/ml, in 0.05 M Carbonatpuffer (pH 8.2) pro Mulde beschichtet. Serumverdünnungen mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 in PBS wurden hinzugefügt (100 µg/Mulde) und die Platten wurden bei 37°C 24 Stunden lang inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotinyliertes  $\gamma$ -kettenspezifisches Ziegen-Antimaus-IgG (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt und die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden 100 µl peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Pharmingen) zu den Zellen hinzugegeben und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mittels ABTS in 0,1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4,35), welcher 0,01 %

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielt, entwickelt. Die Ergebnisse wurden entweder nach der Absorption bei 405 nm oder den Endpunkttitern (reziproker log<sub>2</sub> der letzten Verdünnung, welche nach 30 Minuten Inkubation bei 405 nm eine optische Dichte von 0,1 Einheiten über den Werten der negativen Kontrollgruppe ergab) dargestellt.

Trotz der enttäuschenden Ergebnisse, welche bei der *in vitro* Untersuchung von primären dendritischen Zellen unter Verwendung von MALP-2 festgestellt wurden, wurde beschlossen, bei der sekundären *in vivo* Untersuchung Gruppen von Tieren einzubeziehen, die unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans geimpft worden waren. Demzufolge wurden die Mäuse entweder mit dem reinen Modellantigen  $\beta$ -Galactosidase oder mit dem Antigen plus MALP-2 intraperitoneal, subkutan, intradermal und intranasal geimpft. Im Gegensatz zu den Erwartungen stellte man eine starke Adjuvanswirkung fest, wenn das Antigen mit 0,5  $\mu$ g MALP-2 gemischt war, und zwar unabhängig von der Art und Weise der Applikation (Fig. 3). Die stärksten Reaktionen wurden bei den Impfungen intraperitoneal und intranasal festgestellt. Die erhaltenen Antworten waren jedoch immer wenigstens genauso stark (intradermal) oder stärker als bei der Verwendung von Aluminiumhydroxid als Standardadjuvans bei subkutaner Injektion (Fig. 3).

Da bei vorangegangenen Untersuchungen unter Verwendung konventioneller Lipopeptide wesentlich höhere Konzentrationen des als Adjuvans verwendeten Bestandteils gegeben wurden, wurde die Wirkung höherer Dosen von MALP-2 untersucht. Zu diesem Zweck wurden Tiere mit 1  $\mu$ g MALP-2 als Adjuvans über die zwei wirksamsten Immunisationswege (intraperitoneal und intranasal) mit  $\beta$ -Galactosidase geimpft. Im Gegensatz zu den Erwartungen führte die Erhöhung der Dosis von MALP-2 zu einer Aufhebung der Adjuvanswirkung (Fig. 4). Dies zeigte, dass man bei einer Anwendung der Standardkonzentrationen, welche in der Literatur für andere Lipopeptide angegeben sind, bei den *in vivo* Untersuchungen von MALP-2 nicht in der Lage gewesen wäre, eine Adjuvanswirkung auf der Ebene der Humoralantworten festzustellen.

**Beispiel 3: Humorale Immunantworten, angeregt nach Impfung über verschiedene Wege unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans in unterschiedlichen Konzentrationen.**

*Versuchsprotokoll:* Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c- (H-2d) Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und gemäß den örtlichen und EU-Richtlinien behandelt. Gruppen von jeweils 5 Mäusen wurden am Tag 1, 7 und 14 entweder mit 40 µg reiner  $\beta$ -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland), oder unter Zuzusatz von 1 beziehungsweise 0,5 µg synthetischem MALP-2 geimpft. Für die intranasale Verabreichung (i.n.) wurden 10 µl in jedes Nasenloch appliziert, während bei der Injektion intraperitoneal  $\beta$ -Galactosidase mit beziehungsweise ohne MALP-2 in 400 µl PBS re-suspendiert wurde. Die Milzen wurden entfernt und für die Bestimmung der zellulären Immunreaktionen zusammengekommen (gepoolt). Die Zellen wurden in RPMI 1640 ergänzt mit 10 % Kalbsfötenserum, 100 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol und 1 mM L-Glutamin (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Milzzellsuspensionen wurden auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml im vollständigen Medium eingestellt. Sie wurden zu 100 µl/Mulde in einer flachbödigen Mikrotiterplatte (Nunc) mit 96 Mulden eingebracht und diese Platten wurden 4 Tage lang unter Beifügung von 20 µg/ml löslicher  $\beta$ -Galactosidase inkubiert. Während der letzten 18 Stunden der Kultivierung wurden jeder Mulde 1 µCi [<sup>3</sup>H]Thymidin (Amersham International, Freiburg, Deutschland) zugefügt. Die Zellen wurden dann mit einem Zellenernter (Inotech, Wohlen, Schweiz) auf Filterpapier geerntet (Filtermat A; Wallac, Freiburg, Deutschland) und die Menge des in die DNS der vermehrten Zellen eingebetteten [<sup>3</sup>H]Thymidins wurde mit Hilfe eines  $\gamma$ -Scintillationszählers (Wallac 1450, Micro-Trilux) bestimmt. Die Ergebnisse sind als das arithmetische Mittel der [<sup>3</sup>H]Thymidinaufnahme in cpm dargestellt. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindices (SI, cpm Proben/cpm in nicht-stimulierten Kontrollzellen) dargestellt.

Unter Berücksichtigung der überraschenden Verringerung der Adjuvanswirkung auf humoraler Ebene, die bei der Verwendung von MALP-2 in höherer Dosierungen beobachtet wurde, wurde beschlossen, festzustellen, ob eine

ähnliche Wirkung auf der Ebene der zellulären Immunantworten beobachtet werden kann. Demzufolge wurden Mäuse mit entweder reiner  $\beta$ -Galactosidase oder  $\beta$ -Galactosidase gemischt mit 1  $\mu$ g MALP-2 immunisiert. Achtundzwanzig Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Milzen gereinigt, in vitro mit 20  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Galactosidase re-stimuliert und ihre Vermehrungsfähigkeit wurde mit Hilfe der Messung der Einbettung von [ $^3$ H]Thymidin in ihre DNS mittels eines  $\gamma$ -Scintillationszählers bestimmt. Die erzielten Ergebnisse (Fig. 5) bestätigten, dass die Verwendung von MALP-2 in höheren Dosierungen nicht nur dazu führt, dass keine Humoralantworten mehr festgestellt werden können, sondern auch die über die Zellen vermittelte Immunisierung wird verringert.

**Beispiel 4: Gemeinsame intranasale und intraperitoneale Verabreichung von MALP-2 mit einem löslichen Antigen stimuliert wirksame systemische Humoralantworten.**

*Versuchsprotokoll:* Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c- (H-2d) Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und gemäß den örtlichen und EU-Richtlinien behandelt. Gruppen von jeweils 5 Mäusen wurden am Tag 1, 14 und 21 entweder mit 40  $\mu$ g reiner  $\beta$ -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) unter Zumischung von 0.5  $\mu$ g synthetischer MALP-2 beziehungsweise 10  $\mu$ g Cholera toxin B Untereinheit (CTB; ICN Biomedicals Inc., Ohio) als Standardadjuvans geimpft. Für die intranasale Verabreichung (i.n.) wurden 10  $\mu$ l in jedes Nasenloch appliziert, während bei der Injektion intraperitoneal  $\beta$ -Galactosidase mit beziehungsweise ohne MALP-2 in 400, 100 beziehungsweise 100  $\mu$ l PBS re-suspendiert wurde. Serumproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen (Tag 0, 13, 20 und 30) und bei -20°C bis zur Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörper aufbewahrt. Nunc-Immuno MaxiSorp-Testplatten mit 96 Mulden (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 100  $\mu$ l  $\beta$ -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland), mit 5  $\mu$ g/ml, in 0.05 M Carbonatpuffer (pH 8.2) pro Mulde beschichtet. Serielle zweifache Verdünnungen der Seren oder Auswaschungen in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 wurden hinzugefügt (100  $\mu$ l/Mulde) und die Platten wurden bei 37°C 24 Stunden lang inkubiert. Nach dem Spülen wurde



Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt und die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden 100 µl peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Pharmingen) zu den Zellen hinzugegeben und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mittels ABTS in 0,1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4,35), welcher 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielt, entwickelt. Die Ergebnisse wurden als der reziproke log<sub>2</sub> der letzten Verdünnung, welche nach 30-minütiger Inkubation eine optimale Dichte bei 405 nm von 0,1 Einheiten im Vergleich zu den Werten der negativen Kontrollgruppe ergab, dargestellt.

Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse der Vorstudien wurde beschlossen, die bei der Verwendung von MALP-2 als Adjuvans über die beiden wirksamsten Immunisierungswege, nämlich intraperitoneal und intranasal, festgestellten Immunreaktionen detailliert zu analysieren und sie mit denen eines bewährten Schleimhautadjuvans zu vergleichen. Demzufolge wurde die Fähigkeit von MALP-2, wirksame Humoralimmunreaktionen hervorzurufen bewertet, indem die Serumtiter von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörpern bei geimpften Mäusen bestimmt wurden. Wie in Fig. 6A dargestellt, ergab die Administration von reiner  $\beta$ -Galactosidase (50 µg/Dosis) die Induktion sehr niedriger Antikörpertiter, sogar nach einem zweiten Boosting (Endpunkttiter ca. 1000). Im Vergleich dazu induzierte die Administration von  $\beta$ -Galactosidase unter Verwendung von MALP-2 intranasal schon bei einer einfachen Dosis zu Induktion sehr hoher Titer (> 60.000) von spezifischem IgG bei allen Mäusen, und am Ende des Immunisierungsprotokolls lagen die Titer über 500.000 (Fig. 6). Die Kinetik und die Gesamtwirksamkeit der Antikörperreaktionen, die mit 0,5 µg MALP-2 erreicht wurden, waren denen, die mit der Verabreichung von  $\beta$ -Galactosidase mit 10 µg CTB, einem bewährten Schleimhautadjuvans, welches als positive Kontrollsubstanz verwendet wurde, erreicht wurden, sehr ähnlich.

Eine deutliche Adjuvanswirkung wurde auch beobachtet, wenn MALP-2 intraperitoneal appliziert wurde. Insbesondere die Co-Injektion von MALP-2 führte zu einer 100-fachen Steigerung der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen IgG-Titer im Vergleich zu den Titern bei Tieren, welche mit reiner  $\beta$ -Galactosidase immunisiert worden waren (Fig. 6B). Dieser Unterschied war schon nach der ersten

Immunisierung festzustellen und wurde nach Booster-Injektionen aufrechterhalten. Am 31. Tag wurden bei Tieren, die entweder intranasal oder intraperitoneal immunisiert worden waren, ähnliche Antikörpertiter festgestellt. Allerdings waren die Primärreaktionen nach der MALP-2-Co-Injektion nach der intranasal Impfung stärker ausgeprägt.

**Beispiel 5: Intranasale Co-Administration von MALP-2 mit einem löslichen Antigen stimuliert wirksame Schleimhautantikörperantworten.**

*Versuchsprotokoll:* Am 31. Tag wurden die Mäuse getötet und es wurden die endgültigen Proben entnommen. Es wurden Vaginal- und Lungenausspülungen gewonnen, indem die Organe mit 1 ml PBS, ergänzt durch 50 mM EDTA, 0,1 % BSA und 10 mM PMSF gespült wurden. Die Ausspülungen wurden anschließend zentrifugiert, um Gewebstrümmer zu entfernen (10 min bei 3000 x g) und die verbleibende Flüssigkeit wurde bei -20°C aufbewahrt. Um die Konzentration des Gesamt-IgA in der Spülflüssigkeit aus Lunge und Vagina zu bestimmen, wurden serielle Verdünnungen der entsprechenden Proben in Mikrotiterplatten inkubiert, wobei diese Platten zuvor mit Ziegen-Antimaus-IgA (Sigma Chemie) als Einfangantikörper (100 µl/Mulde) überzogen wurden. Es wurden serielle Verdünnungen gereinigter Maus-IgA (Sigma Chemie) zur Erzeugung einer Standardkurve verwendet.

Um die Fähigkeit von MALP-2 zur Stimulierung von Mucosal-Antworten gegen Antigene, die intranasal co-administriert wurden, zu untersuchen, wurde die Produktion von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischem IgA in Lungen- und Vaginalspülflüssigkeit immunisierter Tiere analysiert. Während nach intranasaler Impfung mit reiner  $\beta$ -Galactosidase keine Produktion  $\beta$ -Galactosidase-spezifischer IgA in der Lungenspülflüssigkeit in nachweisbarer Menge erfolgte, wurde bei den mit  $\beta$ -Galactosidase und MALP-2 immunisierten Tieren ein signifikanter Anstieg der Niveaus antigenspezifischer IgA festgestellt (Fig. 7). Die Co-Administration von MALP-2 führte zur Stimulierung einer wirksamen IgA-Produktion auch in entfernt liegenden Schleimhäuten, wie dies durch die Anwesenheit signifikanter Konzentrationen von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischem IgA in der Vaginalspülflüssigkeit nachgewiesen wird (Fig. 7). Es wurden keine

statistisch signifikanten Unterschiede in den Niveaus der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörper in den Schleimhäuten zwischen Tieren, die mit 0.5  $\mu$ g MALP-2 oder 10  $\mu$ g CTB immunisiert worden waren, festgestellt.

**Beispiel 6: Die Immunisierung unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans führt nicht zu mehr Serum-IgE.**

*Versuchsprotokoll:* Zur Bestimmung der Konzentration des Gesamt-IgE im Serum von Immunisierten und Kontrolltieren, wurden serielle Verdünnungen der entsprechenden Proben in Mikrotiterplatten, welche zuvor mit Antimaus-IgE (100  $\mu$ l/Mulde) als Einfangantikörper überzogen wurden, inkubiert. Nach Blockierung mit PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur wurde eine 1:100 -Verdünnung des Serums in PBS-Tween hinzugefügt (100  $\mu$ l/Mulde) und die Platten wurden eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotinyliertes Antimaus-IgE hinzugefügt und die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Spülen wurden 100  $\mu$ l peroxidase-konjugierten Streptavidins (Pharmingen) in die Mulden gegeben und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mittels ABTS in 0,1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4,35) und einem Gehalt von 0,01 %  $H_2O_2$  entwickelt. Es wurden serielle Verdünnungen von gereinigtem Maus-IgE verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen.

Es ist eine anerkannte Tatsache, dass die Verwendung bestimmter Schleimhautadjuvantien aufgrund einer Erhöhung der Produktion von IgE zu allergischen Reaktionen führen kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde damit begonnen, die Wirkung der Verabreichung von MALP-2 auf den Serumgehalt von IgE zu prüfen. Wie aus Fig. 8 hervorgeht, führt die Administration von MALP-2 über den parenteralen (i.p.) Weg bzw. die Schleimhäute nicht zu einer Erhöhung des Serumgehaltes an IgE. Im Gegenteil, die Anwesenheit von MALP-2 scheint sogar eine positive Wirkung auf die Steigerung des IgE-Gehaltes zu haben wie sie am 28. Tag nach der Impfung mit reiner  $\beta$ -Galactosidase intraperitoneal beobachtet wurde.

**Beispiel 7: MALP-2 stimuliert effektive durch T-Zellen vermittelte Proliferationsreaktionen, wenn es gemeinsam mit einem löslichen Antigen verabreicht wird.**

*Versuchsprotokoll:* Unter dem Unterkiefer gelegene Lymphknoten und die Milzen wurden entfernt und für die Analyse der Zellimmunreaktionen zusammengenommen. Die Zellen wurden in RPMI 1640, ergänzt durch 10 % fötales Kalbsserum, 10 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin,  $5 \times 10^{-6}$  M 2-Mercaptoethanol und 1 mM L-Glutamin (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) vermehrt und bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Die Suspensionen aus Lymphknoten- und Milzzellen wurden auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml im vollständigen Medium eingestellt, in eine flachbördige Mikrotiterplatte mit 96 Mulden (Nunc) mit 100 µl/Mulde ausgebracht, und die Platten wurden vier Tage lang in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen löslicher  $\beta$ -Galactosidase inkubiert. Jede Konzentration wurde in Dreiergruppen geprüft. Während der letzten 18 Stunden der Inkubierung wurde jeder Mulde 1 µCi [<sup>3</sup>H]Thymidin (Amersham International, Freiburg, Deutschland) zugefügt. Anschließend wurden die Zellen auf Filterpapier (Filtermat A; Wallac, Freiburg, Deutschland) unter Verwendung eines Zellernters (Inotech, Wohlen, Schweiz) geerntet und die Menge des eingebetteten [<sup>3</sup>H]Thymidins in die DNS der vermehrten Zellen wurde mit Hilfe eines  $\gamma$ -Scintillationszählers (Wallac 1450, Micro-Trilux) bestimmt. Die Ergebnisse wurden als das arithmetische Mittel der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Thymidin in cpm dargestellt.

Die Immunreaktionen von T-Zellen wurden am 31. Tag untersucht, indem die Vermehrung der Zellen, welche aus regionalen Lymphknoten und Milzen nach der in vitro Re-Stimulierung mit  $\beta$ -Galactosidase gewonnen wurden, bestimmt wurde. Die Milzzellen von Tieren, welche mit reiner  $\beta$ -Galactosidase intraperitoneal geimpft worden waren, wurden als positive Kontrollgruppe verwendet und zeigten eine signifikante Vermehrungsreaktion im Vergleich zur nichtimmunisierten Gruppe (Fig. 9A). Eine weitere Steigerung der Proliferation wurde bei Milzzellen festgestellt, welche von Tieren stammten, die eine Co-Injektion von MALP-2 und Antigen erhalten hatten ( $p < 0,05$ ). Während die intranasale Administration von reiner  $\beta$ -Galactosidase keine nachweisbare Zellvermehrung hervorrief, führte die Milzvermehrung von MALP-2 zu einer

effektiven Proliferationsantwort sowohl bei regionalen (Lymphknotenzellen) als auch bei systemischen (Milzzellen) (Fig. 9B und C). Bemerkenswert ist, dass die stärkste T-Zell-Proliferation bei den Milzzellen von Mäusen beobachtet wurde, bei denen MALP-2 und  $\beta$ -Galactosidase intranasal appliziert worden waren (Fig. 9B). In allen Fällen wurde eine deutlich dosisabhängige Wirkung durch die Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidase-Konzentration während der Re-Stimulierung festgestellt (5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Letztlich führte die Verwendung von MALP-2 (0.5  $\mu\text{g}$ ) als Adjuvans zu einer statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Steigerung der T-Zellenvermehrung im Vergleich zur intranasal Immunisierung mit (10  $\mu\text{g}$ ) plus  $\beta$ -Galactosidase (Fig. 8B).

#### **Beispiel 8: Analyse von T-Helfermustern hervorgerufen durch die Verwendung von MALP-2 als Adjuvans**

*Versuchsprotokoll:* Nunc-Immuno MaxiSorp Testplatten mit 96 Mulden (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden beschichtet mit 100  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) bei 5  $\mu\text{g/ml}$  in 0.05 M Carbonatpuffer (pH 8.2) pro Mulde. Es wurden serielle Zweifachverdünnungen von Serum oder Spülflüssigkeit in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 hinzugefügt (100  $\mu\text{l}$ /Mulde) und die Platten wurden 2 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotin-konjugiertes Ratten-Antimaus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, beziehungsweise -IgG3 (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) zugefügt, um die Ig-Unterklassen zu bestimmen. Die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden den Zellen 100  $\mu\text{l}$  peroxidase-konjugierten Streptavidins (Pharmingen) zugefügt und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mit ABTS in 0.1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4.35) welcher 0,01 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  enthielt, entwickelt. Um die Konzentration der IgG-Unterklassen im Serum zu bestimmen, wurden Standardkurven erzeugt, indem die Mulden mit einem isotyp-spezifischen Ziegen-Antimaus-IgG beschichtet und dann mit gereinigter Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b beziehungsweise -IgG3-Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert wurden.

Flüssigkeitsüberstände von Kulturen sich vermehrender Zellen wurden an den Tagen 2 und 4 entnommen und bei -70 °C aufbewahrt. Die Bestimmung von IFN- $\gamma$  IL-2, IL-4, und IL-10 wurde mittels ELISA ausgeführt, wobei kommerzielle Antikörper von Pharmingen gemäß den Herstelleranweisungen verwendet wurden. Kurz gesagt, wurden Mikrotiterplatten mit 96 Mulden über Nacht mit gereinigtem Ratten-Antimäus-IFN- $\gamma$ , anti-IL-2, anti-IL-4 beziehungsweise anti-IL-10 mAbs (Pharmingen) bei 4 °C beschichtet. Nach drei Spülungen wurden die Platten blockiert und die Flüssigkeitsüberstände wurden in die Mulden gegeben. Für jedes Zytokin wurde eine Standardkurve erzeugt, indem die entsprechenden rekombinanten Nagetierzytokine (Pharmingen) verwendet wurden. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur weitere 4 Stunden lang inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotinyliertes Ratten-Antimäus-IFN- $\gamma$  IL-2, IL-4 beziehungsweise -IL-10 mAbs (Pharmingen) in die Mulden gegeben und die Platten wurden eine Stunde lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach sechsfachem Spülen wurde Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugefügt und die Platten wurden 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten wie oben beschrieben mit ABTS entwickelt.

Zuerst wurde die Unterklassenverteilung des  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen IgG analysiert, welches im Serum der Immunisierten Mäuse vorhanden war. Wie in Tabelle 1 dargestellt, war der Haupttyp der  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen IgG-Isotypen IgG1, unabhängig vom Immunisierungsprotokoll. Dieses dominante Th2-Reaktionsmuster war schon nach der ersten Impfdosis erkennbar und blieb während der folgenden Booster erhalten. IgG1 war der einzige Isotyp, welcher bei der Verabreichung reiner  $\beta$ -Galactosidase festgestellt wurde, während die Co-Administration mit CTB oder MALP-2 zur Feststellung weiterer  $\beta$ -Galactosidase-spezifischer Isotypen, nämlich IgG2a (Typ Th1), IgG2b (Typ Th2) und IgG3 (Typ Th1) führte. Trotzdem blieb das Verhältnis von IgG1/2a (Fig. 10), IgG1/2b beziehungsweise IgG1/3 größer als 100.

Tabelle 1.  $\beta$ -Galactosidase-spezifische IgG-Isotypen im Serum immunisierter Mäuse<sup>a</sup>

Immunisierungsgruppe	IgG1			IgG2a			IgG2b			IgG3		
$\beta$ -gal (i.n.)	22,6	+/-	21,3	0,7	+/-	0,5	0,3	+/-	0,1	0,6	+/-	0,0
$\beta$ -gal. + MALP-2 (i.n.)	6439,0	+/-	1775,5	20,8	+/-	5,4	43,3	+/-	18,9	2,4	+/-	0,5
$\beta$ -gal + CTB (i.n.)	4108,3	+/-	1437,1	31,9	+/-	9,5	49,2	+/-	17,3	2,4	+/-	0,6
$\beta$ -gal (i.p.)	191,5	+/-	132,1	0,1	+/-	0,0	0,5	+/-	0,1	0,6	+/-	0,0
$\beta$ -gal + MALP-2 (i.p.)	2829,7	+/-	1119,9	10,0	+/-	2,8	15,8	+/-	6,2	2,3	+/-	0,6
Kontrollgruppe	0,4	+/-	0,0	0,23	+/-	0,0	0,1	+/-	0,0	0,4	+/-	0,0

<sup>a</sup> Die Ergebnisse sind als das Mittel ( $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$  SEM dargestellt (5 Mäuse pro Gruppe)

Um die Art der Th-Reaktion, welche durch die Immunisierung hervorgerufen wurde, weiter zu charakterisieren, wurde der Gehalt an IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 und IL-10 in den Flüssigkeitsüberständen von *in vitro* stimulierten Milzzellen gemessen (Fig. 11A). Es wurde festgestellt, dass von diesen vier Zytokinen IL-10 am stärksten vertreten war, was darauf hinweist, dass ein Th2-Antwortmuster erzeugt worden war. Der Gehalt an IL-10 war bei Mäusen, welche mit MALP-2 intranasal immunisiert worden waren, signifikant höher, als bei der Kontrollgruppe (2,2 ng/ml im Vergleich zu 0,009 ng/ml,  $p < 0,005$ ) und auch im Vergleich zu Tieren, bei denen CTB als Schleimhautadjuvans verwendet worden war (0,6 ng/ml,  $p < 0,05$ ). Das beobachtete Antwortmuster mit einem dominanten Zytokin vom Typ Th2 stimmte mit der Feststellung von  $\beta$ -Galactosidase-spezifischem IgG1 bei denselben Tieren überein (Fig. 10). Tatsächlich stimmt die starke Stimulierung der IL-10-Sekretion mit der Rolle überein, welche dieses Zytokin bei der Hemmung der Zytokinsynthese durch Th1-Zellen, der Verbesserung der B-Zellenvermehrung und der Stimulierung der IgA-Produktion spielt.

Trotz der Tatsache, dass in den Flüssigkeitsüberständen von Zellen, die aus regionalen Lymphknoten gewonnen wurden, geringere absolute Werte der Zytokinkonzentration festgestellt wurden, glich das allgemeine Muster dem für die Milzzellkulturen festgestellten (Fig. 10). Interessant ist, dass zwar die

Ausscheidung von IL-10 und IL-4 auch in den Zellen von Mäusen stimuliert wurde, die mit reiner  $\beta$ -Galactosidase intraperitoneal immunisiert worden waren, die Th1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  aber unter der Nachweisgrenze blieben. Im Gegensatz dazu wurden IL-2 und IFN- $\gamma$  auch bei den Mäusen festgestellt, welche das Antigen gemischt mit CTB oder MALP-2 erhalten hatten (Fig. 10). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den festgestellten IgG-Isotypenmustern (Tabelle 1) und bestätigen, dass zwar Th2-Reaktionstypen vorherrschen, aber MALP-2 auch die Stimulierung von Th1-Zellen unterstützt.

**Beispiel 9: Orale Immunisierung mit dem Modellantigen  $\beta$ -Galactosidase unter Verwendung von MALP-2 als Schleimhautadjuvans.**

Es wird erwartet, dass eine spätere orale Impfung von Mäusen mit einem Antigen in Kombination mit MALP-2 in unterschiedlichen Dosierungen Immunreaktionen sowohl in den Körperflüssigkeiten als auch in den Zellen hervorrufen wird, welche wirksamer sind, als die von der alleinigen Verabreichung des Antigens hervorgerufenen. Darüber hinaus wird man in der Lage sein antigenspezifische Schleimhautreaktionen zumindest lokal in den Därmen (d.h. das Vorhandensein von antigenspezifischem sekretorischen IgA in Darmausspülungen) festzustellen. Außerdem wird erwartet, dass es möglich ist, sekretorische Reaktionen in entfernten Schleimhäuten festzustellen.



GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH  
Mascheroder Weg 1  
38124 Braunschweig

5

Unser Zeichen:  
3275-1 EP-1

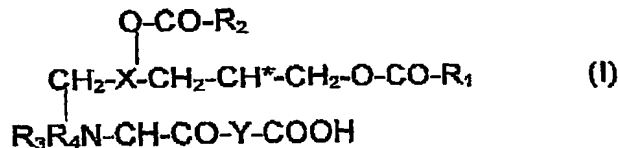
Datum:

April 2002

Patentansprüche:

10 1. Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins der Struktur (I)

15



wobei

20

$\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$ , die gleich oder voneinander verschieden sein können, für  $\text{C}_{7-25}$ -Alkyl,  $\text{C}_{7-25}$ -Alkenyl oder  $\text{C}_{7-25}$ -Alkynyl,

X für S, O oder  $\text{CH}_2$ ,

$\text{R}_3$  und  $\text{R}_4$  unabhängig voneinander für H oder Methyl und

25

Y für eine aus 1 bis 25, vorzugsweise 12 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiologisch verträgliche und in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz stehen

und das mit \* markierte asymmetrische Kohlenstoffatom die absolute S-Konfiguration hat, wenn  $\text{X} = \text{S}$  (Schwefel) ist,

als Mukosal-Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung über die Schleimhäute.

30

- 2 -

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz Y vorzugsweise ausgewählt ist aus.

a) GQTNT

b) SKKKK

5 c) GNNDESNIKFKEK

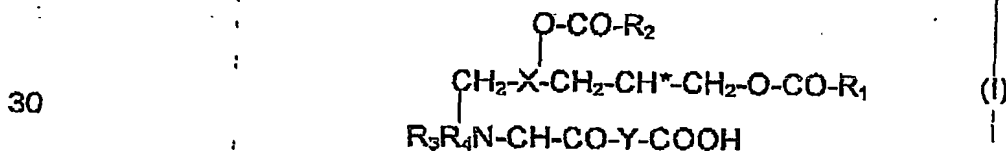
d) GQTDNNSSQSAAPGSGTTNT,

10 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipoprotein oder Lipopeptid gemäß Struktur (I) ein S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(25)-propyl]cysteinyl-peptid ist, wobei das Peptid eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiologisch verträgliche, in der verwendeten Spezies vorzugsweise nicht immunogene Aminosäuresequenz ist.

15 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Mucosal-Adjuvans in einer Zubereitung mit der eigentlichen Vakzin-Komponente vorliegt, die für intranasale, intra-NALT, aerosolisiert orale, intrarektale, conjunctivale, intravaginale oder intraurethrale Applikation oder eine Applikation in die Milchgänge der weiblichen Brust vorgesehen ist.

20 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Mucosal-Adjuvans in einem Kit für die Co-Applikation mit einem Vakzin in die Milchgänge der weiblichen Brust, auf intranasalem, intra-NALT, aerosolisiert oralem, intrarektalem, conjunctivalem, intravaginalen oder intraurethralem Wege vorliegt.

25 6. Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins der allgemeinen Struktur (I)



wobei

R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>, die gleich oder voneinander verschieden sein können, für C<sub>7-25</sub>-Alkyl, C<sub>7-25</sub>-Alkenyl oder C<sub>7-25</sub>-Alkynyl,

35 X für N, O oder CH<sub>2</sub>

- 3 -

R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> unabhängig voneinander für H oder Methyl und Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten, vorzugsweise 12 bis 25 Aminosäureresten, bestehende physiologisch verträgliche und in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz stehen  
 5 und das mit \* markierte asymmetrische Kohlenstoffatom die absolute S-Konfiguration hat, wenn X = S (Schwefel) ist,

ausgenommen eines S-(2,3-Diacyloxypropyl)cystein-peptids der Sequenz DhcGNNDESNISFKEK, wobei N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sein können,  
 10

als Adjuvans bei einer nicht mukosalen Vakzinierung.

15 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein in einer Zubereitung mit wenigstens einem weiteren Adjuvans und/oder Antigen vorliegt.

20 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert oder verbunden ist.

25 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein mit ein oder mehreren entzündungshemmenden, anti-angiogenen, cytotoxischen oder immunmodulatorischen Stoffen oder Liganden oder mit Antikörpern gemeinsam verabreicht wird oder in einer Zubereitung mit diesen vorliegt.

30 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein in einer Zubereitung vorliegt, die weitere Zusatz- und Hilfsstoffe, insbesondere Konservierungsstoffe oder Stabilisatoren, enthält.

- 4 -

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Vakzin, das durch das Adjuvans begleitet wird, in Form von Peptiden, Proteinen, DNA, Polysacchariden, Glykolipiden oder Glykoproteinen.

### Zusammenfassung

Es wird die Verwendung von Lipopeptiden und Lipoproteinen als mukosale Adjuvantien für verschiedenste Vakzinierungen über die Schleimhäute vorgeschlagen, insbesondere auf intranasalem Wege. Bei den Lipopeptiden handelt es sich um am aminoterminalen Cystein eines Peptids oder Proteins 2,3-diacyloxy-(2S)-propyl-substituierte Peptide oder Proteine, bevorzugt aus Mykoplasmen abgeleitete S-(2,3-bispalmitoyloxy-(2S)-propyl)cysteiny-peptide. Die angegebenen Peptide sind bereits in geringen Dosen hochwirksam und führen zu guten Immunisierungsergebnissen und Erhöhung u.a. des IgA Spiegels.

(Fig.7)

Fig. 1

**Expression spezifischer Marker durch aus Knochenmark  
gewonnenen murinen DCs nach Stimulation mit MALP-2 oder LPS**

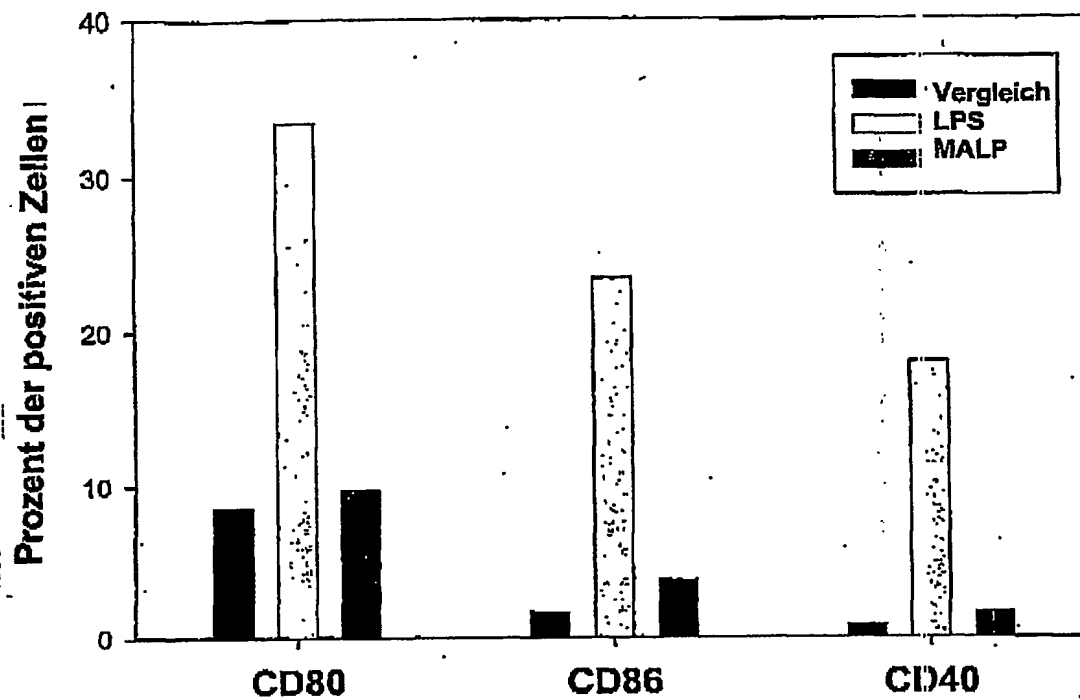


Fig. 2

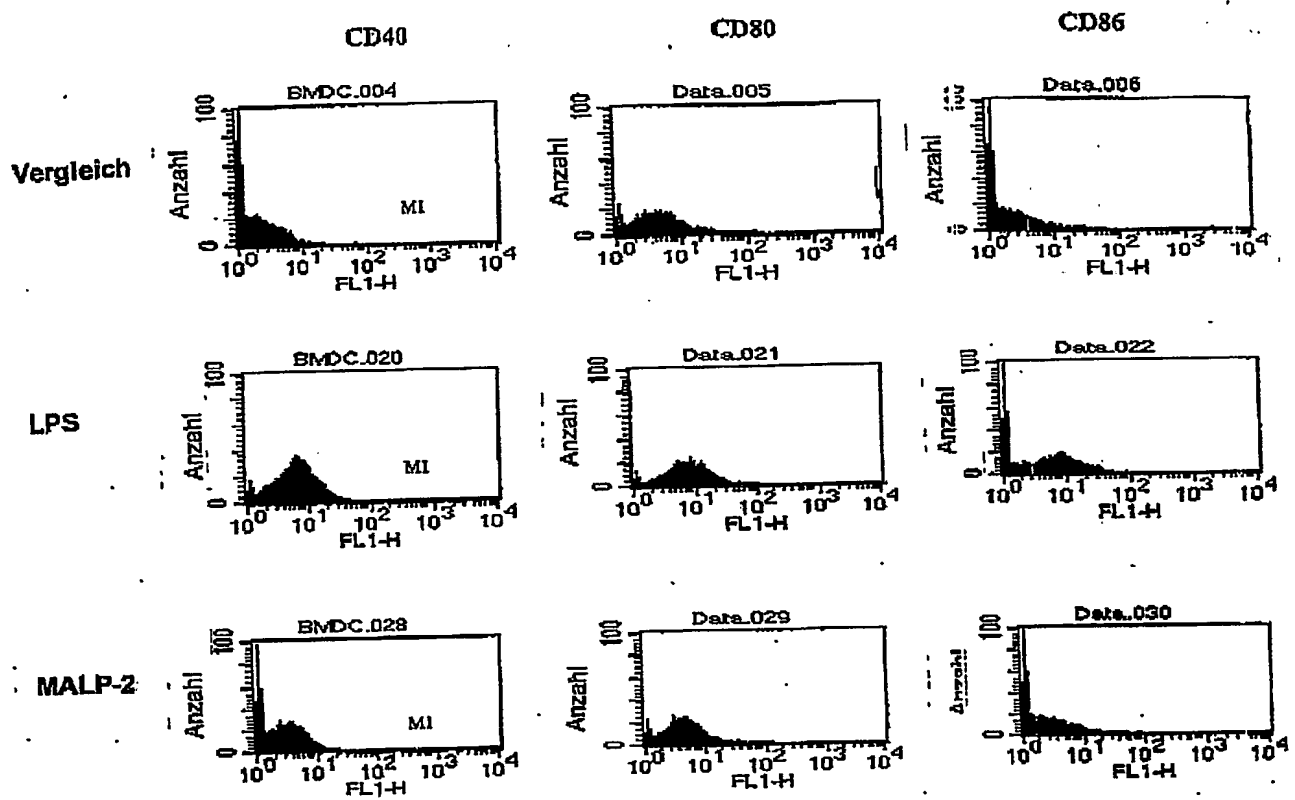


Fig. 3

$\beta$ -galactosidspezifische Serum IgG Reaktion stimuliert  
durch Verwendung von MALP-2 als Adjuvans

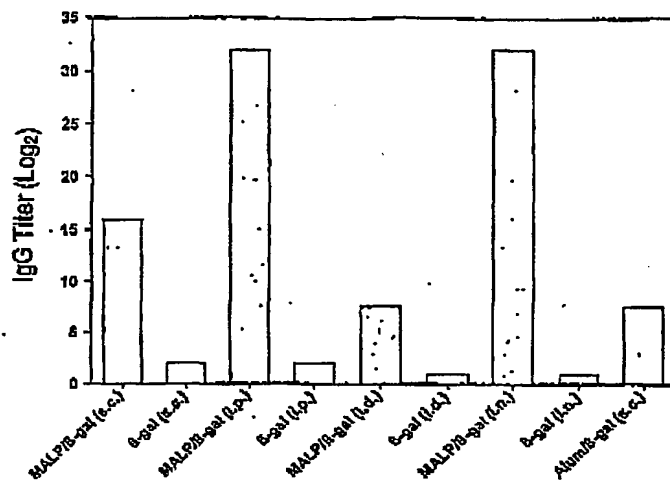




Fig. 4

$\beta$ -galactosidasespezifische Serum IgG Reaktion stimuliert  
durch Verwendung von 1  $\mu$ g MALP-2 als Adjuvans

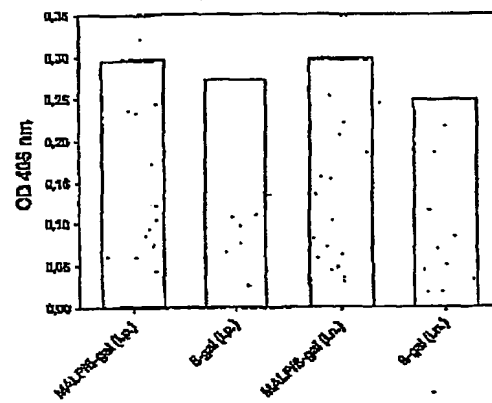


Fig. 5.

$\beta$ -galactosidaspezifische proliferative Reaktionen stimuliert  
durch Verwendung von MALP-2 als Adjuvans

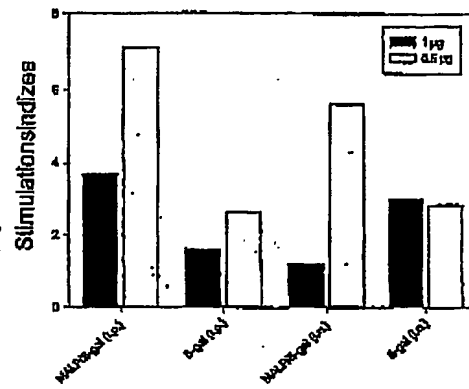


Fig. 6

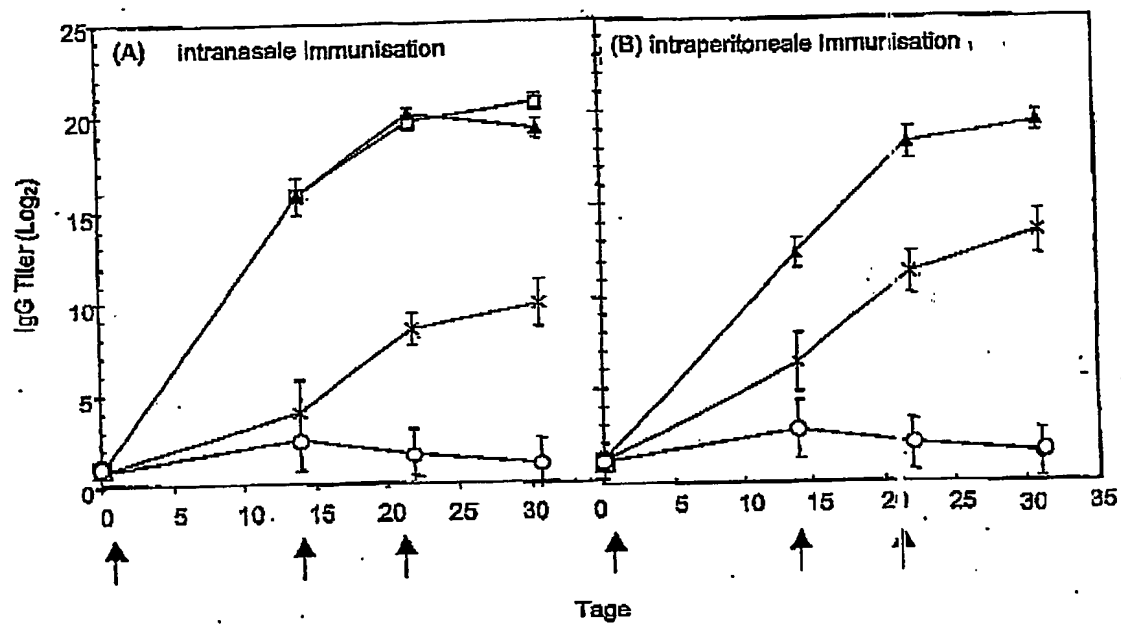


Fig. 7

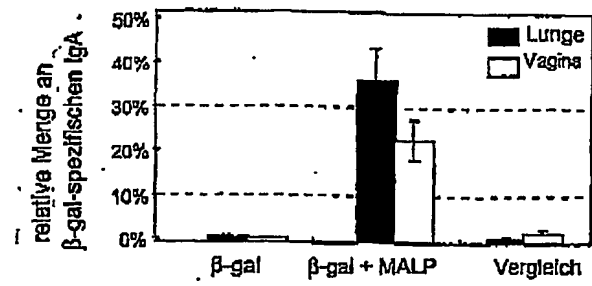


Fig. 8

Bestimmung des Serum IgE bei Tieren, die unter Verwendung  
von MALP-2 als Adjuvans immunisiert wurden

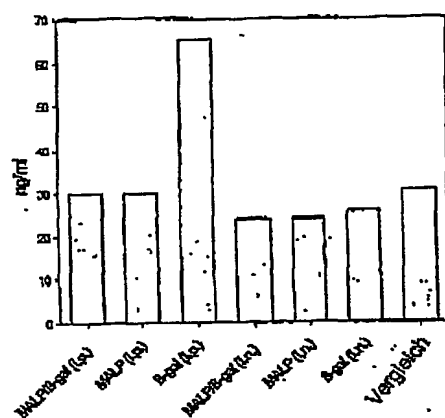


Fig. 9

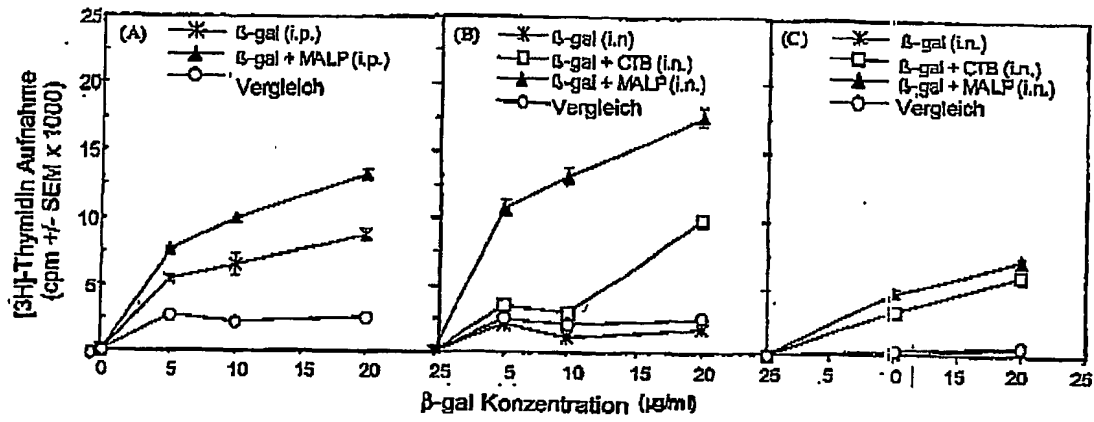


Fig. 10

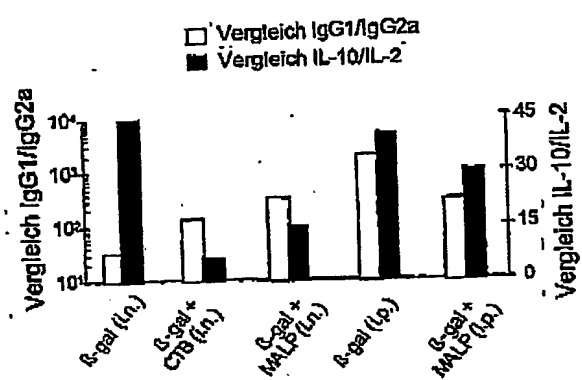
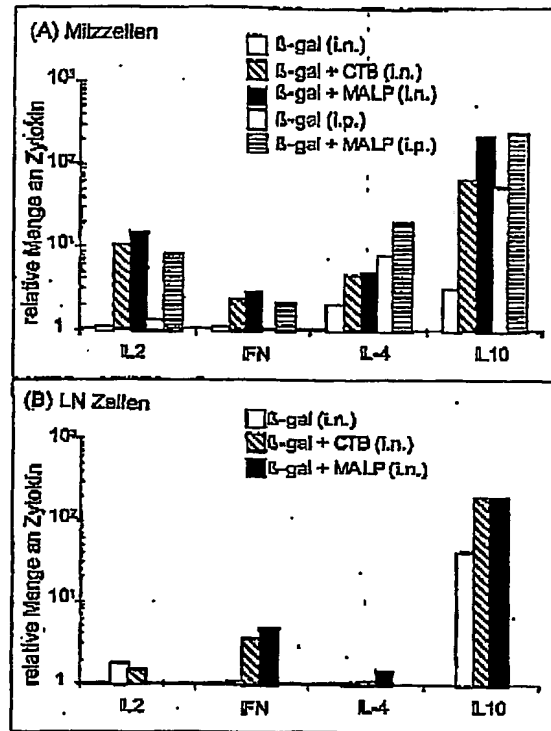


Fig. 11





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**